Eine neue gärungsanalytische Mikromethode zur Bestimmung des wahren Blutzuckers.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt von

Karl Sorgenfrei,

appr. Arzt aus Stendal.

Rostock.
Druck von Carl Hinstorffs Hofbuchdruckerei.
1926.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
zu Rostock.

Referent: Herr Prof. Dr. Grafe.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Zur Bestimmung des Blutzuckers benutzte man bisher die reduzierende Eigenschaft des Traubenzuckers. Da aber außer ihm noch andere Substanzen mit gleicher Eigenschaft, wie Harnsäure, Kreatin, Kreatinin, Aminosäuren, Glucuronsäure, Oxyproteinsäuren, Purin usw., im Blute vorhanden sind, so können die auf diese Weise gefundenen Werte nicht dem wahren Blutzucker entsprechen. Von verschiedenen Autoren wurden daher vergleichende Blutzuckeruntersuchungen mit Reduktionsmethoden und Polarimetrie ausgeführt, um die Frage zu klären, ob und in welchem Maße Fehler hinsichtlich des reinen Blutzuckergehaltes begangen werden. Man fand, daß die Werte im allgemeinen ganz gut übereinstimmten; nur das Diabetikerblut bildete, wie Stepp nachwies, eine Ausnahme. Da nun aber Polarisation und Vergärung fast ausnahmslos identische Zahlen ergaben, so war anzunehmen, daß die so gewonnenen Werte den wahren Zuckergehalt des Blutes darstellten. Vereinzelt wurden auch Methoden angewandt, die auf der Vergärbarkeit des wahren Blutzuckers beruhten. Nur arbeiteten sie teils mit erheblichen Fehlerquellen, teils waren sie äußerst kompliziert und beanspruchten so große Blutmengen, wie sie zu Reihenuntersuchungen wohl selten zur Verfügung stehen werden.

Unter der Anleitung von Herrn Professor Grafe habe ich daher eine einfache gärungsanalytische Methode zur Bestimmung des wahren Blutzuckers ausgearbeitet.

Die neue Methode beruht darauf, daß der Druck der durch Vergärung des Blutzuckers gebildeten Kohlensäure im Barcroft'schen Blutgasmanometer bestimmt wird. Hieraus läßt sich nach den Gasgesetzen die gebildete Menge Kohlensäure und daraus dann die vorhandene Zuckermenge berechnen.

Das gärungsanalytische Verfahren ist aber nur unter zwei Voraussetzungen brauchbar. Erstens darf das entwickelte Gas nur aus Kohlensäure bestehen.

Lavoisier und Gay Lussac nahmen noch an, daß bei der Gärung der Zucker in Alkohol und Kohlensäure zerfällt und drückten dies durch die Gleichung $C_6H_{12}O_6 = 2CO_2 + 2C_2H_6O$ aus. Seitdem ist aber von vielen Autoren nachgewiesen, daß außer Alkohol und Kohlensäure noch verschiedene Nebenprodukte entstehen (vgl. vor allem die Arbeiten von Neuberg und seinen Mitarbeitern). Diese können aber unberücksichtigt bleiben, da CO_2 das einzig in Betracht kommende Gas ist, wenn in genügend großer Menge Wasser vorhanden ist, das den Alkohol zurückhält.

Zweitens dürfen im Blute keine anderen vergärbaren Substanzen außer Traubenzucker in irgendwie in Betracht kommender Menge vorhanden sein. Zwar vergärt die Hefe außer Zucker noch andere organische Verbindungen, wie Brenztraubensäure, Milchsäure und einzelne Aminosäuren, unter Kohlensäureentwicklung. Die Substanzen sind aber selbst in diabetischem Blute entweder gar nicht oder nur in ganz minimalen Mengen vorhanden. Es ist wohl ausgeschlossen, daß sie quantitativ in Betracht kommen, auch wenn sie in der kurzen Versuchszeit vergoren würden. Allerdings muß darauf verzichtet werden, in allen Fällen die nach den Formeln zu errechnende maximale Kohlensäure zu erhalten. Selbst bei Verwendung großer Zuckermengen ist dies noch niemals gelungen. Dann liegen aber bei den hier in Betracht kommenden kleinen Mengen von Zucker und Hefe die Dinge besonders ungünstig. Anscheinend hängt das damit zusammen, daß ein Teil des Zuckers nicht vollständig vergoren wird, ein anderer als Glycogen abgelagert wird. Ferner wird trotz des schwach sauren Mediums, in dem gearbeitet wird, etwas Kohlensäure in der Suspensionsflüssigkeit physikalisch absorbiert. Es ist daher notwendig, jedesmal als Testobjekt eine genau bekannte Menge chemisch reinen Traubenzuckers zu vergären und die dabei er-

zielten Manometerausschläge der Berechnung der Blutzuckerwerte zugrunde zu legen. Auf diese Weise wird auch die Berechnung wesentlich vereinfacht. Da unvorbehandelte Hefe, abgesehen von der Gärung, noch einen Gaswechsel besitzt, im Folgenden als „biologischer Faktor" bezeichnet, der durch Atmung, Selbstgärung, Glycogenbildung, Vermehrung oder unbekannte intermediäre Umsetzungen der Hefezellen hervorgerufen wird, so ist es wichtig, eine Aufschwemmung der Hefe selbst, als zweite Kontrolle, zu verwenden. Als dritte Kontrolle dient der Thermobarograph.

Langhans hat im hiesigen Laboratorium bereits, von diesem Gedanken ausgehend, gezeigt, daß eine derartige gärungsanalytische Methode theoretisch möglich ist. Wegen der durch die Ungleichwertigkeit der Hefe bedingten, sehr wechselnden Gärungsausschläge war jedoch die Methode in der damaligen Form praktisch unbrauchbar.

Wie aus dem Folgenden hervorgeht, ist es mir nun gelungen, der verschiedenen praktischen Schwierigkeiten Herr zu werden und so zu einer klinisch brauchbaren Methode zu gelangen. Die Schwierigkeiten bestanden vor allem in dem wechselnden Verhalten der Hefe. Bevor ich die Methodik in ihrer letzten und zuverlässigsten Form beschreibe, will ich auf die Schwierigkeiten näher eingehen, indem ich den Weg schildere, der zum Ziele führte.

I. Vorversuche.

Die Gärkraft der käuflichen Hefepräparate, die aus den verschiedensten Quellen auch außerhalb von Rostock bezogen wurden, schwankte oft außerordentlich und war manchmal sehr gering. Dazu gesellte sich die wechselnde, oft sehr beträchtliche Größe des biologischen Faktors. Da die Buchner'sche Zymase oder sonstige wirksame Hefe-Extrakte nicht zu erhalten waren, mußten Hefe-Reinkulturen verwandt werden, die teils durch die

Liebenswürdigkeit von Herrn Professor v. Wasielewski vom Hygienischen Institut Rostock, teils durch das Institut für Gärungsgewerbe in Berlin bezogen wurden.

Zu den ersten Versuchen, in denen Hefe-Reinkulturen zur Verwendung kamen, wurden mehrere Bierwürzagar-Schrägröhrchen mit oberjähriger oder Weinhefe beimpft. Nach 24- bzw. 48-stündigem Aufenthalt im Brutschrank, je nachdem gutes Wachstum eingetreten war, wurde jedes Röhrchen kurz vor Beginn des Versuches mit 1—2 ccm Ringerlösung beschickt, und die Hefezellen durch leichtes Schütteln abgeschwemmt. Bei dieser Art der Hefegewinnung mußte aber zuckerhaltiges Material, vielleicht durch allzu lange Berührung der Ringerlösung mit dem Nährboden, mit in die Versuchsgefäße gelangt sein, denn in einem Prüfungsversuche zeigte das Manometer der Hefekontrolle einen Anstieg um 14 Strich, während der Thermobarograph nur um 4 Strich und die Temperatur um 0,2° gestiegen waren. Bei einem weiteren Versuche wurden die Kulturen nach Hinzugeben der Ringerlösung kurz abgeschwemmt, die Aufschwemmungen in ein besonderes Gefäß getan, und dieses wurde 20 Minuten lang in den Thermostaten gehängt, damit eventuell hineingekommener Zucker vergoren würde. Im Versuch zeigt die Hefekontrolle nach kurzem Ansteigen um 1 Strich rapiden Abfall. In den anderen Apparaten, die die zu untersuchenden Blutmischungen und die Zuckerkontrolle enthalten, ist die Gärung nach 15 Minuten beendet. Nach dieser Zeit fangen auch diese Manometer an zu fallen. Es scheint also, als ob in den Gefäßen, in denen gleich Gärung eintritt, die zum Leben der Zellen nötige Energie anfangs durch Spaltung des Zuckers in Alkohol und Kohlensäure, dann aber, gleichwie in der nicht gärenden Hefekontrolle von Anfang an, durch Sauerstoffaufnahme erzielt wird. Dieser Befund deckt sich

völlig mit dem von Langhans, der auch experimentell nachgewiesen hat, daß die ständig wachsende Druckabnahme auf Sauerstoffzehrung zurückzuführen ist. Durch welche Kraft der Abfall bedingt wird, ist schwer festzustellen. Trotz obiger Vorbehandlung der Hefeaufschwemmung zeigte sich bei einer Reihe von Versuchen auch ein Anstieg der Hefekontrolle. Dieser kann nur durch Selbstgärung der Hefe veranlaßt sein. Nach Siebeck soll bei längerer Versuchsdauer das Resultat auch durch Zellvermehrung in unberechenbarer Weise beeinflußt werden.

Die Blutmischung wurde so hergestellt, daß 0,3 ccm Venenblut mit 0,3 ccm Essigsäure und 0,9 ccm Aqua dest. solange kräftig geschüttelt wurden, bis völlige Hämolyse eingetreten und die im Blut vorhandene Kohlensäure restlos ausgetrieben war. Von dieser Mischung wurden 1,0 ccm zum Versuch verwandt. Daß die Essigsäure sämtliche Kohlensäure aus dem Blut vertrieben hatte, zeigten Versuche, in denen neben den sonstigen Kontrollen auch eine Blutkontrolle mit eingefügt wurde. Zu 1,0 ccm Blutmischung kam anstatt der 0,5 ccm Hefeaufschwemmung, 0,5 ccm Aqua dest. Die Schwankungen der Manometer-Sperrflüssigkeit dieser Kontrolle waren analog der des Thermobarographen. Entsprechend den 0,2 ccm Blut in 1,0 ccm Blutmischung, befanden sich in der Zuckerkontrolle 0,2 ccm einer 0,1 %igen Zuckerlösung in 1,0 ccm Ringerlösung. Da die Manometerausschläge bisher noch nicht befriedigend waren, wurde versucht, mit mehr und nicht so stark verdünntem Blut zu arbeiten. 2,0 ccm Blut wurden mit 0,2 ccm einer 5 %igen Natriumcitratlösung versetzt, um die Gerinnung zu verhindern, und zur Herbeiführung der Hämolyse hierzu 1,0 ccm einer Saponinlösung getan, bestehend aus 0,5 g Saponin, 100,0 ccm 0,5 %iger Essigsäure. Ein so angesetzter Versuch ergab aber keine größeren Manometerausschläge an den

Gärgefäßen. Die verminderte Gärkraft ist vielleicht durch das Einwirken von Giften auf die Zellen zu erklären. Hierdurch wird die Lebenstätigkeit, also auch die Zymasebildung, herabgesetzt, mithin die Gärung gehemmt. Es ist schwer zu entscheiden, welche Gifte da in Frage kommen. Vielleicht handelt es sich, wie speziell in diesem Versuche, um den Einfluß des Saponins. Zur Klärung dieser Tatsache könnte vielleicht das folgende Protokoll des Versuches vom 3. IV. 1924 mit beitragen. Gleichzeitig kam es hier darauf an, die Frage zu lösen, ob es möglich sei, durch geeignete Vorbehandlung die Hefe an das Gärmedium zu gewöhnen, und dadurch die Gärkraft zu steigern. (S. Tabelle I.)

Verwandt wurden 2 Blutmischungen. Die eine, wie im vorhergehenden Versuche, bestehend aus 2,0 ccm Blut + 0,2 ccm Natriumcitrat 5 %ig + 1,0 ccm Saponinlösung, die andere, analog den ursprünglichen Versuchen, bestehend aus 1,0 ccm 1 %iger Essigsäure + 1,0 ccm Blut + 3,0 ccm Aqua dest. Jedesmal die Hälfte der Mischungen wurde mit einer genügend großen Menge unaufgeschwemmter Hefe versetzt. Nach kräftigem Umschütteln kamen die beschickten Gefäße auf 5 Stunden in den Brutschrank. Hiernach wurde 15 Minuten lang zentrifugiert, wodurch die Hefezellen vom Blutgemisch getrennt wurden, welch letzteres vorsichtig, um keine Hefe mitzubekommen, abpipettiert wurde. Zur Aufschwemmung des Bodensatzes blieb etwas von der Blutmischung im Röhrchen zurück. Die Versuchsanordnung ist aus der Tabelle zu ersehen.

Das mit Traubenzucker versetzte vergorene Saponin-Blutgemisch bleibt hinsichtlich der Ausschläge hinter dem ebenso behandelten anderen vergorenen Blutgemisch zurück. Entsprechende Differenzen zeigen die Manometer der mit den beiden unvergorenen Gemengen versehenen Apparate. Leider fehlt, infolge zu geringen

Tabelle I.

3. IV. 1924. Brennereihefe, Rasse XII. — Saponinlösung: 0,5 g in 100 ccm 0,5%iger Essigsäure. — Traubenzuckerlösung: Von 2%iger Stammlösung: Verdünnung 1 : 20 = 0,1%.

Blutmischung I: 0,2 ccm Natriumcitrat 5%ig + 2,0 ccm Blut + 1,0 ccm Saponinlösung.

„ II: 1,0 ccm 1%iger Essigsäure + 1,0 ccm Blut + 3,0 ccm Aqua dest.

Blut: W. B. Ulcus ventr.

		1	2	3	4	5	6
Zeit	Temperatur des Thermostaten	2,0 ccm vergorene Blutmischung II + 0,5 ccm **Zuckerlösung** (0,5 mg Zucker) + 0,3 ccm Hefeaufschwemmung	0,8 ccm vergorene Blutmischung I + 1,2 ccm Ringerlösung + 0,5 ccm **Zuckerlösung** (0,5 mg Zucker) + 0,3 ccm Hefeaufschwemmung	**Hefe-Kontrolle** 0,8 ccm vergorene Blutmischung I + 1,7 ccm Ringerlösung + 0,3 ccm Hefeaufschwemmung	0,8 ccm Blutmischung I (0,5 ccm Blut) + 1,7 ccm Ringerlösung + 0,3 ccm Hefeaufschwemmung	2,5 ccm Blutmischung II (0,5 ccm Blut) + 0,3 ccm Hefeaufschwemmung	Thermobarograph. 0,8 ccm Blutmischung I + 2,0 ccm Ringerlösung
8^{55}	34,0°	60 Strich	61 Strich	59 Strich	60 Strich	60 Strich	60 Strich
9^{05}	34,0°	92 „	84 „	54 „	89 „	90 „	58 „
9^{10}	34,0°	102 „	99 „	50 „	92 „	100 „	56 „
9^{15}	34,0°	111 „	99 „	50 „	94 „	109 „	58 „
9^{20}	34,0°	121 „	99 „	50 „	101 „	120 „	60 „
9^{25}	34,0°	121 „	95 „	44 „	99 „	121 „	58 „
9^{30}	34,1°	124 „	98 „	45 „	102 „	126 „	60 „
9^{35}	34,1°	129 „	99 „	44 „	105 „	132 „	64 „
9^{40}	34,0°	125 „	92 „	39 „	100 „	130 „	60 „

Materials, die Hefekontrolle für vergorene Blutmischung II. Spätere auf dieser Basis durchgeführte Versuche zeigten aber ein fast gänzliches Fehlen des biologischen Faktors. Dieser, wie auch vorhergehende Versuche hatten ergeben, daß durch Verwendung der Brennereihefe, Rasse XII, partielle Besserung des biologischen Faktors zu erzielen sei.

Nach dieser Probe ist also anzunehmen, daß die Hefezelle durch Saponinwirkung Einbuße an dauernder Zymaseproduktion erleidet, während sie sich durch Gewöhnung den Blutgiften anzupassen sucht. Weitere Versuche lehrten, daß die gleiche Hefe im gleichen Medium (Blutgemisch) außerordentlich gleichmäßig vergärt. Daß dies auch bei höheren Zuckerkonzentrationen zutrifft, soll die angeführte Tabelle II zeigen.

Hier wurden 0,5 ccm einer 0,1-, 0,15-, 0,2- und 0,3 %igen reinen Traubenzuckerlösung zu vergorener Blutmischung von vier verschiedenen Kranken hinzugesetzt und nebeneinander vergoren. Der gärungsanalytisch gefundene Zuckergehalt entspricht dem vorhandenen. Dieser Versuch beweist auch, daß die Herkunft des vergorenen Blutes ohne Einfluß auf den Gärungsvorgang ist.

Tabelle III soll beweisen, daß Aceton und Acetessigsäure keine gärfähigen Substanzen sind.

So wurden allmählich auf dem Wege mancher Mißerfolge die für die Hefewirkung optimalen Bedingungen enuiert.

II. Beschreibung der Methodik.

a) Herstellung der Blutmischung.

Aus der gestauten Armvene werden mit der Spritze 1,0 ccm Blut entnommen und in ein steriles Porzellanschälchen ausgespritzt. Mit einer genau geeichten Pipette wird ein bestimmter Teil (0,5 ccm) in ein weites

Tabelle II.

28. V. 1924. Brennereihefe, Rasse XII.

Blut: I. J. Diabetes; II. W. nihil; III. N. Tbc.; IV. W. Ulcus ventr.

Zeit	Temperatur des Wasserbades	1 1,0 ccm vergorene Blutmischung I + 0,5 ccm einer 0,15 %igen Zuckerlösung + 0,3 ccm Hefeaufschwemmung	2 1,0 ccm vergorene Blutmischung II + 0,5 ccm einer 0,2 %igen Zuckerlösung + 0,3 ccm Hefeaufschwemmung	3 1,0 ccm vergorene Blutmischung III + 0,5 ccm einer 0,3 %igen Zuckerlösung + 0,3 ccm Hefeaufschwemmung	4 1,0 ccm vergorene Blutmischung IV + 0,5 ccm einer 0,1 %igen Zuckerlösung + 0,3 ccm Hefeaufschwemmung	5 **Hefe-Kontrolle** 1,5 ccm vergorene Blutmischung IV + 0,3 ccm Hefeaufschwemmung	6 **Thermobarograph** 1,8 ccm Ringerlösung
9 30	30,3 °	30 Strich	30 Strich	30 Strich	30 Strich	29 Strich	30 Strich
9 40	30,3 °	90 „	107 „	124 „	69 „	29 „	30 „
9 45	30,4 °	110 „	135 „	170 „	85 „	32 „	32 „
9 50	30,3 °	121 „	155 „	200 „	93 „	34 „	33 „
9 55	30,3 °	127 „	164 „	217 „	95 „	32 „	32 „
10 00	30,2 °	129 „	166 „	224 „	96 „	31,5 „	31 „
10 05	30,1 °	129 „	167 „	227 „	95 „	27 „	27 „
10 10	30,1 °	129 „	166 „	227 „	95 „	27 „	27 „
Unterschied gegenüber Anfang		+ 99 „	+ 136 „	+ 197 „	+ 65 „	— 2 „	— 3 „
Korrigierter Ausschlag		+ 101 „	+ 138 „	+ 199 „	+ 67 „	—	—
% Gehalt		0,152 %	0,202 %	0,303 %	0,100 %		

Tabelle III.

Zeit	Temperatur des Thermostaten	1 1,4 ccm vergorene Blutmischung + 0,1 ccm Aceton + 0,3 ccm Hefeaufschwemmung	2 1,4 ccm vergorene Blutmischung + 0,1 ccm Acetessigsäureester + 0,3 ccm Hefeaufschwemmung	3 **Zuckerkontrolle.** 1,4 ccm vergorene Blutmischung + 0,1 ccm 0,5 %iger Zuckerlösung (0,5 mg) + 0,3 ccm Hefeaufschwemmung	4 **Hefekontrolle.** 1,5 ccm vergorene Blutmischung + 0,3 ccm Hefeaufschwemmung	5 **Thermobarograph** 1,5 ccm Ringerlösung
7^{40}	30,8°	60 Strich	60 Strich	60 Strich	60 Strich	60 Strich
7^{50}	30,8°	61 „	64 „	99 „	60 „	60 „
7^{55}	30,9°	62 „	62 „	108 „	62 „	60 „
8^{00}	30,8°	64 „	64 „	115 „	64 „	62 „
8^{05}	30,8°	62 „	60 „	115 „	60 „	59 „

Reagensglas übergeführt und mit der gleichen Menge Aqua dest. und 1 %iger Essigsäure versetzt. Man verwendet zweckmäßig ein und dieselbe Pipette und läßt Aqua dest. und Essigsäure sehr langsam auslaufen, weil dann an der Innenwand haftendes Blut nicht verloren geht. Durch längeres, kräftiges Schütteln tritt Hämolyse ein, die Kohlensäure wird ausgetrieben und das Hamoglobin maximal mit Sauerstoff gesättigt. Beides ist für eine genaue Bestimmung unbedingt erforderlich. Ist die Hämolyse nicht vollständig, so kommt das Blutgemisch in eine Gefriermischung, in der es erstarrt. Vollkommene Lösung tritt bei dem darauf folgenden Erwärmen ein. Selbstverständlich muß dann vor Inarbeitnahme das Blut nochmal stark geschüttelt werden. Zum Absetzen der Stromata wird die Mischung $^1/_4$ Stunde lang zentrifugiert und die überstehende klare Flüssigkeit für den Gärversuch benutzt. Stehen nur kleine Mengen Blut zur Verfügung, so kommt das Gemisch unzentrifugiert zur Verwendung.

b) Hefebereitung.

Ein kleines, steriles Erlenmeyerkölbchen oder Zentrifugenröhrchen, das zu $^2/_3$ mit steriler Bierwürze gefüllt ist, wird unter aseptischen Kautelen mit einigen Platinösen von einer gärkräftigen Brennereihefe-Reinkultur auf Bierwürzagar beimpft und mit sterilem Stopfen verschlossen. Die Hefe ist am besten vom Institut für Gärungsgewerbe in Berlin zu beziehen. Der Stamm ist, zumal nach Umzüchten, beliebig lange haltbar. Nach 24stündigem Aufenthalt im Brutschrank bei 30 °C., dem Temperaturoptimum der obengenannten Rasse, hat sich unter starkem Schäumen ein dicker Bodensatz von Hefe gebildet, der von der Bierwürze abzentrifugiert wird.

Zur Erhaltung eines reinen Stammes dieser gut und gleichmäßig vergärenden Hefe ist folgendes Ver-

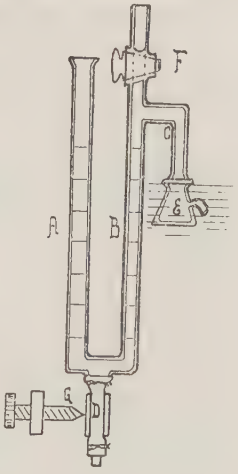
fahren sehr empfehlenswert. Vor dem Zentrifugieren überimpft man eine Platinöse von dem Bodensatz auf ein Bierwürzagar-Schrägröhrchen. Nachdem die Kultur im Brutschrank gut gewachsen ist, hebt man sie bis zum Beginn der nächsten Woche bei Zimmertemperatur auf. Zur Weiterzüchtung für den nächsten Versuch gibt man täglich von der Hefekultur im flüssigen Nährboden mehrere Tropfen wieder in Bierwürze. Am Beginn jeder neuen Woche impft man dann von der sieben Tage zuvor auf festem Nährboden angelegten Kultur in das flüssige Medium über und legt hiervon sowohl eine neue Stammkultur auf Schrägagar als auch eine Kultur in flüssiger Bierwürze an, von der wiederum die Fortzüchtung für die täglichen Versuchskulturen in der oben angegebenen Weise ihren Ausgang nimmt.

Um den abzentrifugierten Bodensatz der Versuchshefe von noch vergärbaren Substanzen zu befreien, wird er in durch Kochen sterilisiertem, lauwarmem Wasser zwei- bis dreimal aufgeschwemmt, gewaschen und zentrifugiert. Nach dem letzten Zentrifugieren wird der Bodensatz mit der dreifachen Menge Ringerlösung aufgeschwemmt. Von dieser Hefeaufschwemmung wird 0,2 ccm mit 1 ccm einer nach a) hergestellten Blutmischung vermischt. Es ist dabei gleichgültig, was für ein Blut verwandt wird, da bei den Versuchen keine sicheren Unterschiede zwischen vergorenem Diabetiker- und Normalblut hinsichtlich der Beeinflussung der Gärung gefunden wurden. Diese Blutmischung, die für die Zucker- und Hefekontrolle nach Abzentrifugieren benutzt wird, ist nach vierstündigem Aufenthalt im Brutschrank völlig vergoren. Diese Art der Hefebereitung hat den Vorteil, daß die Hefe, wie bereits oben erwähnt, sich dem Gärmedium schon angepaßt hat. Desgleichen hat sie ganz oder fast ganz ihren, den Versuch sonst so störenden, biologischen Faktor verloren. Die abzentrifugierte Hefe wird dann ihrerseits in etwa der

doppelten Menge Blutgemisch aufgeschwemmt, wovon 0,3 ccm für den Gärversuch verwandt werden.

c) Apparatur.

Verwandt wurden die Barcroft'schen Blutgasmanometer, und Gefäße von der Form kleinster Erlenmeyerkölbchen mit sackartiger Ausbuchtung, wie sie Siebeck für seine R-N-Bestimmungsmethode verwandte. Bezüglich der Einzelheiten sei auf die Darstellung von Siebeck in Abderhalden's Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden verwiesen. Hier befinden sich auch genaue Angaben über die sehr einfache Eichung der Apparatur, d. h. die Bestimmung des Volumens. An dem mit einem Hahn F verschließbaren Schenkel B ist das mit sackartiger Ausbuchtung versehene Kölbchen E luftdicht angeschlossen. Die benutzten Kölbchen hatten alle fast die gleiche Größe (17—18 ccm). Wegen der Einfachheit der Berechnung ist dies sehr zu empfehlen. Die Kölbchen kommen in ein permanentes Dauerbad, von ca. 30 °, in den Thermostat. Dieser ist ein Blechkasten, an dessen langer Seite Platz für 9 Manometer ist. Eine allzu große Wärmeabgabe wird durch eine darum gelegte Filzschicht und einen auflegbaren Deckel vermieden. Die Heizung geschieht auf elektrischem Wege durch 3 Heizspulen mit Einzelschaltung. Ein Elektromotor setzt durch Transmissionen sowohl ein Rührwerk, das für die gleichmäßige Durchmischung des Thermostatenwassers sorgt, als auch die Schüttelvorrichtung für die Barcroft'schen Apparate in Gang. Diese Einrichtung ist folgendermaßen. Die Apparate, je zwischen zwei Dornen, hängen an einer Stange, die über den oberen



Rand des Thermostaten auf Rollen durch ein Antriebssystem hin und her geschoben wird. Die Holzunterlage der Manometer wird ungefähr in der Mitte durch einen Dorn an der Außenwand des Blechkastens festgehalten. Durch Einschaltung verschiedener Glühbirnen als Widerstände und geeigneter Transformationsscheiben, läßt sich jede gewünschte Stärke des Schüttelns herbeiführen. Innerhalb der kurzen Versuchszeit von 30—45 Minnten ist eine Temperaturkonstanz, möglichst bis auf 0,1 °, dringend erforderlich. Sie läßt sich durch wechselnde Einschaltung der drei Heizspulen erzielen. Das Ein- und Ausschalten der Spulen geschieht entweder elektrisch-automatisch durch einen auf 0,05 ° Temperaturdifferenz reagierenden Toluolregulator oder persönlich unter genauer Beobachtung des Manometerstandes des Thermobarographen. Doch kann bei gleichmäßigem Gasdruck die Regulation auch durch einen kleinen Bunsenbrenner vorgenommen werden.

Der Thermobarograph ist die erste der zu jeder Versuchsreihe gehörenden drei Kontrollen. Er ist der Apparat, der zur Bestimmung der Temperatur- und Druckschwankungen mit einer bestimmten Menge Ringerlösung gefüllt ist.

Die Hefekontrolle dient zur Beurteilung des biologischen Faktors, worunter, wie anfangs erwähnt, Selbtsgärung der Hefe oder Sauerstoffzehrung zu verstehen ist.

Die Zuckerkontrolle bestimmt die Gärkraft der verwandten Hefe — unter Benutzung reiner Traubenzuckerlösung.

d) Beschreibung der Durchführung eines Versuches im einzelnen.

Das Kölbchen wird aus seinem Glasschliff herausgenommen. Es ist unbedingt erforderlich, daß es absolut rein und lufttrocken ist. Auf seinen Boden bringt

man mit genau geeichter Pipette 1,5 ccm der in der oben beschriebenen Weise hergestellten Blutmischung. Man muß die Flüssigkeit langsam ausfließen lassen, damit nichts an der inneren Pipettenwand hängen bleibt. Eine umgebogene Pipette bringt 0,3 ccm der Hefeaufschwemmung in die sackartige Ausbuchtung. Hierbei ist streng darauf zu achten, daß kein Tropfen daneben gerät oder an der Wand in die Blutmischung hineinrinnt. Nach dem Hinzugeben der Hefeaufschwemmung ist es ratsam, die Umgebung der Einmündung des Sackes sorgfältig mit Fließpapier abzutupfen. Jeder Versuch, in dem Hefe in das Blutgemisch hineinkommt, ist unbrauchbar. Das Kölbchen ist frisch zu reinigen, zu trocknen und abermals zu beschicken. Aehnlich geschieht die Füllung des Apparates für die Zuckerkontrolle. An die Stelle des Blutes tritt ein Gemisch, bestehend aus 1,4 ccm einer vergorenen Blutmischung + 0,1 ccm einer 0,5%igen reinen Traubenzuckerlösung. Beim Pipettieren der Traubenzuckerlösung kommt es auf genaues Einhalten des Maßes und auf langsames Ausfließen der Flüssigkeit an, widrigenfalls bei der Berechnung Fehler in der zweiten Dezimalen auftreten. Für die Hefekontrolle werden 1,5 ccm einer vergorenen Blutmischung + 0,3 ccm Hefeaufschwemmung, für den Thermobarographen nur 1,8 ccm Ringerlösung ohne Hefe verwandt. Alsdann werden die Kölbchen unter Drehbewegungen leicht, aber doch luftdicht, auf das gut eingefettete Ansatzstück aufgesetzt, und die fertigen Apparate so an die Wand des Wasserbades gehängt, daß das Wasser die Kölbchen gerade bedeckt. Die Manometer Sperrflüssigkeit der Apparate (Brodie'sche Lösung) wird auf 30 Strich eingestellt. Um einen vollständigen Temperatur- und Druckausgleich zu schaffen, wird mit offenen Hähnen etwa 10 Minuten langsam geschüttelt. Nach Ablauf dieser Zeit wird der Hahn des Thermobarographen geschlossen. Bleibt der Druck

während weiterer 5 Minuten konstant, so wird die Einstellung der anderen Apparate auf den Ausgangspunkt beiderseits noch einmal kontrolliert und dann werden auch hier die Hähne geschlossen.

Der eigentliche Versuch beginnt erst jetzt.

Die Manometer werden vorsichtig herausgenommen. In schräger Haltung läßt man, unter Verschluß des freien Schenkels A mit dem Finger, um ein Auslaufen der Flüssigkeit zu verhindern, die Hefe aus der sackförmigen Ausbuchtung in das Innere des Kölbchens ausfließen. Der Sack wird nochmals mit der Gesamtflüssigkeit ausgespült. Bei wieder offenem Schenkel A werden dann die Apparate, die immer luftdicht abgeschlossen sein müssen, in das Wasserbad zurückgebracht und geschüttelt. Schon in den nächsten Minuten beginnt meistens ein deutlicher Anstieg der Sperrflüssigkeit im freien Schenkel der mit Blutmischungen gefüllten Apparate und der Zuckerkontrolle. Nach Abstellung der Schüttelvorrichtung, aber ohne Anhalten des Rührwerks wird alle 5 Minuten eine Ablesung vorgenommen, indem in dem geschlossenen Schenkel B vermittels der Schraube C die Flüssigkeit genau auf den Ausgangspunkt (30 Strich) eingestellt und der gleichzeitige Stand am offenen Rohr A notiert wird.

Sind nicht sehr hohe Blutzuckerwerte vorhanden, so ist die Gärung meist schon nach 20 bis 30 Minuten beendet. Das Ende der Gärung ist daran zu erkennen, daß bei gleichem Thermobarographenstand innerhalb von 5 Minuten kein weiterer Anstieg der Flüssigkeit in A erfolgt. Der Versuch ist erst beendet, wenn wenigstens 2 dieser Ablesungen in den Manometern, die das zu untersuchende Blut enthalten, bei gleichem Thermobarographenstand sich decken. Die Tabelle IV bringt ein Beispiel für den Verlauf eines Versuches nach obiger Methode.

Tabelle IV.

12. VI. 1924 Brennereihefe Rasse XII.

1,5 ccm Blutmischung = 0,5 ccm Blut + 0,5 ccm 1 %ige Essigsäure + 0,5 ccm Aqua dest.

Blut: M. 45 J. schwerer Diabetes mit Sepsis — z. Zt. Spur Acidose.

		1	2	3	4	5
Zeit	Temperatur des Wasserbades	1,5 ccm nicht zentrifugierte Blutmischung + 0,3 ccm Hefeaufschwemmung	1,5 ccm zentrifugierte Blutmischung + 0,3 ccm Hefeaufschwemmung	**Zuckerkontrolle** 1,4 ccm vergorene Blutmischung + 0,1 ccm 0,5 %ige Zuckerlösung + 0,3 ccm Hefeaufschwemmung	**Hefekontrolle** 1,5 ccm vergorene Blutmischung + 0,3 ccm Hefeaufschwemmung	**Thermobarograph** 1,8 ccm Ringerlösung
8^{30}	31,2°	30 Strich	30 Strich	30 Strich	29 Strich	30 Strich
8^{40}	31,2°	189 „	184 „	92 „	31 „	30 „
8^{45}	31,1°	223 „	218 „	98 „	32 „	30 „
8^{50}	31,0°	232 „	230 „	100 „	30 „	30 „
8^{55}	31,0°	234 „	233 „	101 „	30 „	30 „
9^{00}	31,0°	240 „	239 „	104 „	31 „	30 „
9^{05}	31,0°	240 „	238 „	101 „	29 „	28 „
Unterschied gegenüber Anfang		+ 210 „	+ 208 „	+ 71 „	0 „	— 2 „
% Zucker		0,297 %	0,288 %	0,100 %	—	—

In diesem Versuche sollte festgestellt werden, ob die Blutzuckerwerte Unterschiede aufweisen, je nachdem die Stromata der lackierten Blutkörperchen abzentrifugiert sind oder nicht. Daß dies nicht der Fall ist, zeigen die gleichen Ausschläge in den beiden ersten Apparaten. Aus dem Manometerstand der Hefekontrolle ist zu ersehen, daß der biologische Faktor der Hefe gleich Null ist. Der Thermobarograph weist gleichfalls kaum Veränderungen auf. Wie dieser, so beweisen auch ähnliche Versuche, daß die Differenzen in den Parallelapparaten meist nur 1—3 % betragen, wenn der Stand der Hefekontrolle und des Thermobarographen sich kaum ändert. Mit der Zunahme der Ausschläge in den Kontrollen ist auch ein Anwachsen dieses Prozentsatzes verbunden. Weist in der kurzen Versuchszeit ein Versuch in den Kontrollen (Thermobarograph und Hefe) Ausschläge über 10 Strich auf, so unterläßt man lieber seine Verwendung, besonders, wenn es sich um plötzliche Schwankungen handelte. Diese werden durch ungleichmäßige Erwärmung oder Abkühlung hervorgerufen. In solchen Fällen übersteigen die Differenzen noch 5 %. Es ist daher sehr wünschenswert, diese beiden Korrekturen, die bei den Gärungsausschlägen angebracht werden müssen, möglichst niedrig zu halten. Für die Zuckerkontrolle ist ein korrigierter Ausschlag von mindestens 50 Strich zu verlangen.

e) Berechnung eines Versuches.

Die an den Manometern der Gärgefäße abgelesenen Drucksteigerungen, d. h. Differenz zwischen Ausgangs- und Endablesung im Schenkel A bei dauernd beibehaltenem Anfangsstande im Schenkel B, werden nach Veränderungen der Hefekontrolle, die gleichzeitig die Schwankungen des Thermobarographen mit zum Ausdruck bringt, korrigiert. Ist die Hefekontrolle

unter den Ausgangswert abgesunken, so ist die Differenz zwischen Anfang und Ende als positive Korrektur bei den Gärungsausschlägen anzubringen, im anderen Falle als negativer Wert.

Die Zuckerkontrolle enthält soviel Zucker, wie der verwandten Blutmenge entspricht, 0,5 ccm einer 0,1 %igen oder 0,1 ccm einer 0,5 %igen Traubenzuckerlösung, also 0,5 mg. Auf diese 0,1 %ige Ausgangslösung werden, unter Benutzung der Volumina der Gärgefäße, die in der oben genannten Weise korrigierten Ausschläge der Blutgärversuche bezogen. Korrekturen der Luftvolumina erübrigen sich, da es sich um vergleichende Bestimmungen handelt.

Angenommen im zu untersuchenden Blute sei der Prozentgehalt an Zucker X, der korrigierte Manometerausschlag des Blutgärgefäßes in Strichen a, der entsprechende Wert der Zuckerkontrolle c, Va das Volumen des für die Blutzuckerbestimmung, Vc das Volumen des für die Zuckerkontrolle verwandten Apparates nach Abzug der eingefüllten Flüssigkeitsmenge. Dann besteht die Gleichung:

$$X = \frac{0{,}1 \cdot a \cdot Va}{c \cdot Vc} \%$$

Für die in Tabelle V niedergelegten Versuche sind die Luftvolumina der Gefäße:

1., 18,944 — 1,8 = 17,144 ccm,
2., 18,580 — 1,8 = 16,780 ccm,
3., 18,888 — 1,8 = 17,088 ccm,
4., 18,896 — 1,8 = 17,096 ccm.

Mithin erhält man als Zuckerwert für das Blut in:

1., $\frac{0{,}1 \cdot 119 \cdot 17{,}144}{55 \cdot 17{,}096} = 0{,}217\ \%$;

2., $\frac{0{,}1 \cdot 154 \cdot 16{,}780}{55 \cdot 17{,}096} = 0{,}275\ \%$;

Tabelle V.

31. V. 1924. Brennereihefe Rasse XII.

1,5 ccm Blutmischung = 0,5 ccm Blut + 0,5 ccm 1 %ige Essigsäure + 0,5 ccm Aqua dest.

Blut: W. P. Diabetes; I nüchtern, II eine Stunde nach einer Schnitte Brot, III drei Stunden nachher.

Zeit	Temperatur des Wasserbades	1 1,5 ccm Blutmischung I (0,5 ccm Blut) + 0,3 ccm Hefeaufschwemmung	2 1,5 ccm Blutmischung II (0,5 ccm Blut) + 0,3 ccm Hefeaufschwemmung	3 1,5 ccm Blutmischung III (0,5 ccm Blut) + 0,3 ccm Hefeaufschwemmung	4 **Zuckerkontrolle** 1,4 ccm vergorene Blutmischung I + 0,1 ccm 0,5 %ige Zuckerlösung (0,5 mg) + 0,3 ccm Hefeaufschwemmung	5 **Hefekontrolle** 1,5 ccm vergorene Blutmischung + 0,3 ccm Hefeaufschwemmung	6 **Thermobarograph** 1,8 ccm Ringerlösung
7 25	31,8 °	30 Strich	30 Strich	30 Strich	30 Strich	30 Strich	30 Strich
7 35	31,7 °	92 „	101 „	96 „	64 „	30 „	30 „
7 40	31,7 °	111 „	126 „	120 „	75 „	32 „	32 „
7 45	31,7 °	130 „	152 „	143 „	84 „	34 „	34 „
7 50	31,6 °	139 „	167 „	158 „	85 „	32 „	31 „
7 55	31,6 °	140 „	179 „	169 „	86 „	31 „	31 „
8 00	31,6 °	148 „	183 „	173 „	84 „	29 „	29 „
Unterschied gegenüber Anfang		+118 „	+153 „	+143 „	+ 54 „	- 1 „	— 1 „
Korrigierter Ausschlag		+119 „	+154 „	+144 „	+ 55 „	—	—
% Zucker		0,217 %	0,275 %	0,262 %	0,100 %	—	—

$$3., \quad \frac{0{,}1 \cdot 144 \cdot 17{,}088}{55 \cdot 17{,}096} = 0{,}262\ \%.$$

Die entsprechenden Angaben für die in Tabelle IV registrierten Versuche sind:

Luftvolumen 1., 18,944 — 1,8 = 17,144 ccm,
„ 2., 18,580 — 1,8 = 16,780 ccm,
„ 3., 18,896 — 1,8 = 17,096 ccm.

Mithin erhält man hier als Zuckerwert für das Blut in:

$$1., \quad \frac{0{,}1 \cdot 210 \cdot 17{,}144}{71 \cdot 17{,}096} = 0{,}297\ \%;$$

$$2., \quad \frac{0{,}1 \cdot 208 \cdot 16{,}780}{71 \cdot 17{,}096} = 0{,}288\ \%.$$

Zur Durchführung der Blutzuckerbestimmung mit dieser Methode ist eine gewisse Laboratoriumseinrichtung Voraussetzung. Die Methode steht weder an Einfachheit noch Genauigkeit hinter den bisherigen klinischen Reduktionsmethoden zurück. Besonders gut eignet sie sich für Serienuntersuchungen. Je mehr es mit zunehmender Uebung und bei Verwendung einer guten gärkräftigen Hefereinkultur gelingt, Schwankungen in der Hefekontrolle und im Thermobarographen zu vermeiden, um so besser werden die Resultate.

Mit der geschilderten Methode wurden drei Versuche bei Gesunden, 24 bei Diabetikern, 30 bei anderen Kranken ohne Hyperglykämie, 6 bei anderen Kranken mit Hyperglykämie durchgeführt. Gleichzeitig wurde in dem Blut derselben Entnahme das Reduktionsvermögen nach der kolorimetrischen Methode von Benedict bestimmt. Kam keine besondere Fragestellung in Betracht, so wurden sämtliche Blutentnahmen morgens nüchtern vorgenommen. Ueber die Versuche ist an anderem Orte näher berichtet (Grafe und Sorgenfrei). Hier seien nur kurz die wichtigsten Resultate mitgeteilt.

Die Gärungsmethode ergab bei Gesunden die gleichen Werte, wie Benedict's Verfahren. Dies stimmt mit den Angaben der Literatur überein. Zwar muß berücksichtigt werden, daß beide Methoden mit maximal je 5 % Fehler arbeiten. Die Reduktionsmethoden ergaben also hier einen guten Anhaltspunkt für die Menge des wahren Blutzuckers. Die tatsächlichen kleinen Unterschiede fallen in das Bereich der Fehlerquellen.

Die Versuche bei nichtdiabetischen Kranken ergaben keine wesentlich anderen Resultate. Es ist daher anzunehmen, daß die Reduktionswerte auch bei nichtdiabetischen Kranken den wahren Blutzucker annähernd genau angeben.

Grundsätzlich anders fällt der Vergleich zwischen Reduktions- und Gärungswerten bei vielen Diabetikern aus. Mit zunehmender Schwere der Erkrankung weichen im allgemeinen die Paralleluntersuchungen in steigendem Maße voneinander ab. Bei leichten Fällen ist die Differenz manchmal nur angedeutet, bei mittelschweren und schweren Fällen liegen die mit der Gärungsmethode gewonnenen Werte bis 0,1 % tiefer als die Reduktionszahlen. Die üblichen Reduktionsmethoden ergeben also hier falsche Resultate für den wahren Blutzucker. Das Hauptverwendungsgebiet der neuen Methode erstreckt sich daher auf die Untersuchung von Diabetikerblut.

Die chemische Natur dieser reduzierenden aber nicht gärfähigen Substanzen ist vorläufig noch unbekannt. Aus vergleichenden Blutzuckeruntersuchungen nach Traubenzuckerkaramel- (vergoren) bzw. Insulinzufuhr bei Diabetikern läßt sich folgern, daß das Insulin, und teilweise auch das vergorene Karamel, die nicht zuckerartigen, reduzierenden Differenzsubstanzen ganz oder doch zum Teil aus dem Blute zum Verschwinden bringt.

Literatur.

1. Stepp: Der Restkohlenstoff des Blutes bei Gesunden und Kranken. Münch. med. W., 1919, S. 771.
2. Stepp: Beiträge zur Kenntnis der reduzierenden Substanzen des Blutes. Ztschr. f. physiol. Chemie, Bd. 107, 29, 1919.
3. Stepp: Erg. d. Phys. XX, S. 108, 1922.
4. Metzger: Ueber eine neue Methode zur Untersuchung des Blutes auf Zucker. Münch. med. W., 1920, S. 320.
5. Bang: Der Blutzucker. Wiesbaden 1913, Verlag von J. F. Bergmann.
6. Riesberg u. Straßner: Ztschr. f. phys. Chemie 88, 199, 1913.
7. Maase u. H. Tachau: Ztschr. f. Klin. Med. 81, I, 1905.
8. Neuberg u. Hirsch: Erg. d. Phys. XXI, I. Abt., S. 400, 1923.
9. Neuberg u. Hildesheimer: Biochem. Ztschr. 31, 170, 1911.
10. Grafe, E.: Naturf. u. med. Ges. in Rostock. Sitzung am 8. II. 23. Ref. Münch. med. W., S. 82, 1923.
11. Langhans, G.: Versuche zur Mikrobestimmung des wahren Blutzuckers. Inaug.-Diss. Rostock 1922.
12. Siebeck: Beiträge zur Analyse sehr kleiner Stickstoffmengen in organ. Material. Dtsch. Archiv f. klin. Med. 116, 58, 1914.
13. Siebeck: Messung der Oxydation und Gärungsgeschwindigkeit in Zellen. Abderhaldens Handbuch d. biol. Arbeitsmethoden, Abt. IV, T. 10, Lief. 102, S. 251, 1923.

14. Barcroft: The respiratory function of the Blood. University Press Cambridge, 1914.
15. Benedict: Journ. of biol. Chem. 34, 1918, S. 203.
16. Magin u. Turban: Deutsches Archiv f. klin. Med. 143, S. 97, 1923.
17. Grafe, E., u. v. Schröder, E.: Deutsches Archiv f. klin. Med. 144, S. 156, 1924.
18. Lippmann: Die Chemie der Zuckerarten, Bd. I, S. 374.
19. Schumm, O.: Ueber den Zuckergehalt des Blutes. Ztschr. f. physiol. Chemie, Bd. 96.
20. Grafe, E., u. Sorgenfrei: Deutsches Archiv f. Klin. Med. 145, S. 294, 1924.

Lebenslauf.

Verfasser dieser Arbeit wurde am 20. Februar 1899 zu Stendal geboren. Seine Ausbildung begann auf dem dortigen Gymnasium. Vom 1. Juli 1917 bis Sommer 1919 stand er im Heeresdienste. Mit dem Sommersemester 1919 begann er das Universitätsstudium in Jena und setzte es in Heidelberg, Berlin und Rostock fort. Hier bestand er am 3. Dezember 1923 die ärztliche Prüfung und erhielt am 15. Dezember 1924 die Approbation als Arzt.